

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Cell Biology**

Doktorský studijní program: Vývojová a buněčná biologie
Ph.D. study program: Developmental and Cell Biology

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



Proliferace a dynamika tkání během vývoje zubů a jim příbuzných
patrových lišt
Cell proliferation and tissue dynamics during development of teeth and
tooth related palatal rugae

Mgr. Michaela Rothová

Školitel /Supervisor: MUDr. Renata Peterková, Csc.
Školitel-konzultant/Supervisor–consultant: Abigail Tucker Ph.D.

Praha 2011

Obsah/Table of Contents

Abstrakt	4
1. Úvod	5
1.1 Zubní vývoj u myši	5
1.2 Diastemové rudimenty – ztracené premoláry u myši dentice	5
1.3 Nadpočetné zuby u myši dentice.....	6
1.4 První molár myši dentice a vývoj zubního mezenchymu.....	6
1.5 Vývoj patrových lišt u myši	7
2. Cíle práce.....	8
2.1 Vývoj rudimentálních zubních základů v tvářové oblasti myši dolní čelisti a úloha buněčné proliferace.....	8
2.2 Vznik zubní papily myšního prvního moláru.....	8
2.3 Vznik a rozmístění patrových lišt a úloha buněčné proliferace	8
3. Materiál a metodika	9
4. Výsledky a diskuse	11
4.1 Vývoj rudimentálních zubních základů v tvářové oblasti myši dolní čelisti a úloha buněčné proliferace.....	11
4.1.1 Revitalizace rudimentálního R2 zubního pupene u Sprouty2 myších mutantů – role buněčné proliferace a porovnání vůči apoptóze.....	11
4.2 Vznik zubní papily myšního prvního moláru.....	12
4.2.1 Přispění mezodermy do vyvíjející se myši zubní papily	12
4.3 Vznik a rozmístění patrových lišt a úloha buněčné proliferace	13
5. Závěry	14
5.1 Vývoj rudimentálních zubních základů v tvářové oblasti myši dolní čelisti a úloha buněčné proliferace.....	14
5.2 Vznik zubní papily myšního prvního moláru.....	14
5.3 Vznik a rozmístění patrových lišt a úloha buněčné proliferace	15
5.4 Obecný závěr	15
6. Použitá literatura/References	16
7. Životopis.....	20
8. Seznam publikací/List of publications.....	22
Abstract.....	23
1. Introduction	24
1.1 Tooth development in mouse.....	24
1.2 Diastemal rudiments – lost premolars in mouse dentition	24
1.3 Supernumerary teeth in mouse dentition.....	25

1.4 The first molar in mouse dentition and dental mesenchyme development.....	25
1.5 Palatal rugae development in mouse.....	26
2. Aims of the thesis	27
2.1 Development of the rudimental cheek tooth primordia in mouse mandible and the role of cell proliferation.....	27
2.2 Origin of the dental papilla of the first mouse molar	27
2.3 Palatal rugae origin, spacing and the role of cell proliferation.....	27
3. Material and Methods	28
4. Results and discussion	30
4.1 Development of the rudimental cheek tooth primordia in mouse mandible and the role of cell proliferation.....	30
4.1.1 Revitalization of the rudimental R2 tooth bud in Sprouty2 mouse mutants – A role of cell proliferation and comparison to apoptosis.....	30
4.2 Origin of the dental papilla of the first mouse molar	31
4.2.1 Contribution of mesoderm into the developing mouse dental papilla	31
4.3 Palatal rugae origin, spacing and the role of cell proliferation.....	32
5. Conclusions	33
5.1 Development of the rudimental cheek tooth primordia in mouse mandible and the role of cell proliferation.....	33
5.2 Origin of the dental papilla of the first mouse molar	33
5.3 Palatal rugae origin, spacing and the role of cell proliferation.....	34
5.4 General conclusion.....	34
6. Curriculum vitae	35

Abstrakt

V této dizertační práci jsem se zaměřila na otázky týkající se buněčné proliferace a dynamiky tkání u tří klíčových oblastí obličejového vývoje: během potlačení nebo revitalizace zubních pupenů, které se vyvíjejí v myši embryonální dentici jako pozůstatky ztracených premolárů; během vzniku zubní papily a zubního folikulu prvního myšího moláru; a během vzniku patrových lišt na ústním povrchu tvrdého patra u myši.

Buněčnou proliferaci v tvářové oblasti dolní čelisti jsme porovnávali u méně a více vývojově pokročilých myších zárodků na embryonálním dni 13,5, v období předpokládané zástavy růstu premolárového rudimentu R2. Ukázali jsme, že růst rudimentu R2 je potlačen v důsledku nízké míry buněčné proliferace a vysoké míry apoptózy. Zajímavé bylo, že při narušení Sprouty signalizace, R2 rudiment vykazoval podobnou míru proliferace a apoptózy jako progresivně rostoucí první molár. V důsledku těchto změn se R2 rudiment u Sprouty 2 mutantních myši revitalizoval a vyvinul v nadpočetný zub před prvním molárem. Dále jsme objevili, že během stádia zubního pupenu a pohárku, je zubní mezenchym velmi dynamická tkáň, a že zubní papila prvního myšího moláru vzniká pouze z omezené populace buněk původní kondenzace zubního mezenchymu. Studovali jsme identitu buněk zubní papily, které nejsou odvozené od buněk neurální lišty, a prokázali jsme, že jsou jimi mesodermové endothelové buňky, které začínají imigrovat do zubní papily na embryonálním dni 15,0. Buněčná proliferace se ukázala jako významný faktor během vzniku a rozmístění patrových lišt. Prokázali jsme vysokou míru proliferace nejen v oblasti vzniku nové lišty, ale také při tvorbě mezer mezi patrovými lištami.

Tato dizertační práce přináší nové významné poznatky o vzniku epitelových derivátů – experimentálně prokazuje výskyt a osud zubních premolárových rudimentů v myši dentici; navrhuje nový model vzniku myší zubní papily a mechanismus odpovědný za vznik a rozmístění patrových lišt u myši.

Klíčová slova: myš, vývoj, zub, rudiment, zubní mezenchym, papila, folikul, patrová lišta.

1. Úvod

Zuby a patrové lišty jsou důležitou součástí hlavového vývoje, procházejí podobnými vývojovými procesy a jsou fascinujícími modely organogeneze. Tyto struktury patří mezi epitelové přívěsky a studium jejich vzniku je důležité pro porozumění mechanismů vzniku a vývoje dalších příbuzných orgánů.

1.1 Zubní vývoj u myši

Zuby se vyvíjejí ze zubního epitelu a mezenchymu odvozeného od buněk neurální lišty. Jejich vývoj je řízen recipročními interakcemi a epitelovými signalizačními centry (Butler 1956). Během embryonálního vývoje zubů u myši, zubní epitel se ztlušťuje během embryonálního dne (ED) 11,5, invaginuje do okolního kondenzujícího mezenchymu a vytváří zubní pupen (ED13,5). Zubní epitel roste a nejdříve vytváří sklovinný orgán ve tvaru zubního pohárku (ED14,5) a později zubního zvonku (ED16,5), s vytvářející se zubní papilou mezi prodlužujícími epitelovými smyčkami. Zubní mezenchym dává vznik zubní papile, která se později stane zubní dření se zásobením krevních cév a nervů, ale také zubnímu folikulu, který později tvoří periodontium: cementoblasty, periodontální ligament a alveolární kost (Ten Cate et al. 1971; Yoshikawa & Kollar 1981; Palmer & Lumsden 1987; Diep et al. 2009).

1.2 Diastemové rudimenty – ztracené premoláry u myši dentice

Myší dentice je redukováná a skládá se z jedné sady zubů. V každém čelistním kvadrantu můžeme nalézt jeden řezák oddělený od třech molárů bezzubou oblastí nazývanou diastema, kde jsou u jiných druhů přítomny řezáky, špičáky a premoláry. U některých jiných nebo vymřelých hlodavců, a u králíků, se premoláry vyvíjejí v oblasti před moláry (Luckett and Hartenberger 1985). I přes to, že u myši dospělé dentice chybí premoláry, existují morfologické důkazy, že během embryonálního vývoje myši se dříve a před moláry vyskytují velké zubní pupeny, které byly interpretovány jako rudimentální premolárové pupeny (Peterková 1983; Peterková et al. 1995, 1996, 2000, 2002, 2006; Lesot et al. 1998; Viriot et

al. 2000). Avšak vývoj těchto rudimentálních pupenů pro zatím nebyl prokázán pomocí experimentální nebo molekulární studie. Zřejmě z tohoto důvodu tyto velké zubní pupeny objevující se v tvářové oblasti jako první struktury během odontogeneze, tedy před ED14,0, jsou stále považovány za vyvíjející se první molár (M1) (např. <http://bite-it.helsinki.fi/>). Proto je velmi důležité zmapovat osud rudimentálních pupenů, lokalizaci Shh exprimujících signalizačních center a udělat analýzu časoprostorových změn buněčné proliferace během počátečního progresivního růstu a následného zastavení rudimentálních zubních základů před M1.

1.3 Nadpočetné zuby u myší dentice

U některých myších mutantů se před M1 v původně bezzubé diastemě vyskytuje nadpočetný zub. Tyto případy jsou výsledkem narušení molekulární signalizace mutací některých genů. Např. Sprouty geny, u kterých je zvýšena FGF signalizace v oblasti diastemy (Klein et al. 2006).

Původ nadpočetného zubu před M1 z rudimentálního diastemového zubního základu byl podpořen morfologickými (Peterková et al. 2002, 2005, 2006) a molekulárními (Klein et al. 2006; Ohazama et al. 2008) daty. Avšak stále ještě chybí průkaz vlivu morfogenetických mechanismů, jako je buněčná proliferace nebo apoptóza, při revitalizaci diastemového premolárového rudimentu.

1.4 První molár myší dentice a vývoj zubního mezenchymu

Od ED14,0 dále, M1 představuje prominentní strukturu myší embryonální tvářové oblasti. Na tomto stádiu se začíná vytvářet zubní papila. Kondenzovaný mezenchym obklopující zubní epitel pupenu a pohárku je považován za pasivní tkáň, která je obklíčena vrůstajícími epitelovými smyčkami. Avšak nedávná studie ukázala, že zubní mezenchym na obou stranách zubního pupene je dynamická buněčná populace přispívající ke vzniku zubního folikulu a alveolární kosti (Diep et al. 2009). Proto osud buněk původní kondenzace zubního mezenchymu, jejich přispění ke vzniku zubní papily a folikulu a buněčná proliferace během vzniku zubní papily je důležitou informací chybějící v současné literatuře.

Zubní mezenchym pochází z buněk neurální lišty (Chai et al. 2000). Avšak již tito autoři poukázali na přítomnost buněk jiného původu, které se vyskytují v zubním mezenchymu od stádia zubního pupene dále a jejich původ je neznámý. Společně se studií osudu zubního mezenchymu během vzniku zubní papily, je nutné odhalit identitu buněk zubního mezenchymu, které nepocházejí z buněk neurální lišty, zda a kdy mezodermové buňky přispívají ke vzniku zubní papily.

1.5 Vývoj patrových lišt u myši

Patrové lišty, které mají společný vývojový původ se zuby (Peterková 1985) jsou rovnoběžné příčné lišty přítomné na tvrdém patře a společně se zuby a jazykem se účastní žvýkání, ale i zvedání patrových plotének a tvorby sekundárního patra během embryogeneze (Luke 1984; Peterková et al. 1987).

Laboratorní myši mají většinou 8 až 9 pravidelně uspořádaných lišt. Počátek vývoje patrových lišt u myši začíná podobně jako zubní vývoj. Epitel se ztlusťuje a společně s kondenzujícím mezenchymem na ED11,5 vytváří základ lišty. Další krok vývoje patrových lišt je vypoulení ztlusťelého epitelu do ústní dutiny a vytvoření primitivní lišty. Primitivní lišty se objevují postupně a na stádiu ED15,5 je na patře přítomna i posledně vznikající lišta. Na ED17,5 lišty začínají keratinizovat a vytváří definitivní lišty tvrdého patra (Peterková et al. 1987).

Vývoj patrových lišt poskytuje nový a jednoduchý model pro studium mechanismů vzniku a vývoje epitelových přívěsků, jakými jsou i zuby, a může přinést nové poznatky k obecným principům morfogeneze a palatogeneze. Vývoj patrových lišt je zajímavým postupným procesem, který pro zatím nebyl důsledně studován. Existuje mnoho nezodpovězených základních otázek týkajících se přesného časového schématu, jak se patrové lišty během embryonálního vývoje u myši objevují a jakou roli v tomto procesu hraje buněčná proliferace.

2. Cíle práce

2.1 Vývoj rudimentálních zubních základů v tvářové oblasti myši dolní čelisti a úloha buněčné proliferace

Ověřit, zda velké zubní pupeny vyskytující se u WT myši v dolní čelisti na ED12 a ED13 odpovídají různým rudimentálním zubním základům před M1 nebo postupnému vývoji M1.

Publikace 1.

Ověřit hypotézu, že nadpočetný zub vyskytující se u Sprouty2 mutantních myši je výsledkem revitalizace rudimentálního zubního základu před M1, a to zvýšením buněčné proliferace a/nebo snížením apoptózy v epitelu zubních rudimentů.

Publikace 2.

2.2 Vznik zubní papily myšního prvního moláru

Odhalit vznik mezenchymální zubní papily myšního dolního M1, dynamiku a buněčnou proliferaci zubního mezenchymu během vzniku zubní papily a prozkoumat vývojové vztahy mezi kondenzovaným zubním mezenchymem, zubní papilou a folikulem.

Publikace 3.

Analyzovat identitu a načasování přispění buněk mezodermového původu ke vzniku zubní papily myšního dolního M1 a tím určit identitu buněk nepocházejících z neurální lišty.

Publikace 4.

2.3 Vznik a rozmístění patrových lišt a úloha buněčné proliferace

Určit přesné časové pořadí vzniku myších patrových lišt (které mají společný vývojový původ se zuby) a roli buněčné proliferace během vzniku a rozmístění patrových lišt.

Publikace 5.

3. Materiál a metodika

MATERIÁL

CD1 myši – WT outbrední kmen (Charles River)

Sprouty 2 mutantní myši (Klein et al. 2006)

Mesp1cre transgenní myši křížené s R26R myší linií ke konstrukci reportérové linie Mesp1cre/R26R (Saga et al. 1999)

Stádiování

Samice byly připuštěny přes noc a poledne po detekci vaginální zátky bylo určeno jako ED0,5. Ihned po odebrání embrya z dělohy byla určena váha embrya, která je významná pro detailní stádiování embryonálního vývoje (Peterka et al. 2002).

METODY

***In vitro* metoda kultivace tkáňových řezů**

ED13,5; ED14,5 nebo ED15,5 myší dolní čelisti CD1 embryí byly vypreparovány a nasekány pomocí tkáňového sekáčku McIlwain (Mickle Laboratory Engineering Co., Ltd UK) na frontální 250µm tlusté tkáňové řezy a kultivovány *in vitro* (Diep et al. 2009).

DiI a DiO buněčné značení

DiI a DiO (netoxické lipofilní barvy, Invitrogen) byly injikovány do tkáňových řezů před kultivací *in vitro* pomocí ústní pipety nebo injektoru PicoSpritzer III (Intracel).

GFP elektroporace jako buněčné značení

pCAB-mGFP konstrukt, exprimující myristylované zesílené GFP, byl elektroporován do tkáňových řezů obsahujících M1 zubní základ před kultivací *in vitro*.

X-Gal barvení

Myši dolní moláry byly vypreparovány z Mesp1cre/R26R pozitivních embryí a postnatálních hlav (ED14,5; ED15,0; ED16,5; P5; P18), fixovány v 4% PFA 45 minut, nabarveny v X-Gal barvicím roztoku 42 hodin při 37°C, zality do parafinu a nakrájeny pro odhalení aktivity lacZ v buňkách odvozených od mezodermu.

Imuno-fluorescenční barvení

K analýze buněčné proliferace (Ki67 a PH3 protilátky) a detekci endotelových buněk (CD31 protilátka) jsme používali kryo a parafínové histologické řezy a tkáňové řezy po kultivaci *in vitro*.

Ki67 primární protilátka (Králičí polyklonální IgG proti Ki67; Abcam; #Ab15580)

PH-3 primární protilátka (Myši monoklonální IgG proti phosphohistone 3; Abcam; #Ab14955)

CD31 primární protilátka (Králičí polyklonální IgG proti CD31; Abcam; #Ab28364)

Kvantitativní hodnocení mitotického indexu

Hodnocení byly provedeny na sériových frontálních histologických řezech. Počítali jsme procento celkového počtu mitotických buněk z celkového počtu buněk dané oblasti zájmu.

3D rekonstrukce zubního epitelu

Počítačové 3D rekonstrukce vyvíjejícího se dolního zubního a ústního epitelu byly nakresleny ze sériových frontálních histologických řezů (7μm). Digitalizace, porovnání posloupných snímků a vytváření 3D rekonstrukcí bylo provedeno jako popsáno dříve (Lesot et al. 1996).

Whole mount *in situ* hybridizace

In situ hybridizace byly provedeny pomocí standardního protokolu (Hogan et al. 1994) a Shh sonda (získána od Prof. McMahon) byla přepsána *in vitro* z plasmidu popsaného dříve (Echelard et al. 1993).

4. Výsledky a diskuse

4.1 Vývoj rudimentálních zubních základů v tvářové oblasti myši dolní čelisti a úloha buněčné proliferace

Pomocí zmapování Shh exprese, která je charakteristická pro zubní signalizační centra (Thesleff et al. 2001), jsme odlišili sérii tří Shh signalizačních center, které odpovídaly třem po sobě vyvíjejícím se pupenům (MS, R2 a M1). Tento výsledek se důrazně liší od klasické interpretaci Shh exprese v tvářové oblasti myši dolní čelisti. Tato posloupná Shh exprese během ED12 až ED14 je totiž obecně připisována pouze postupnému vývoji M1 (např. Jernvall a Thesleff 2000).

Předpokládá se, že rudimentální zubní pupeny procházejí periodou progresivního růstu před jejich zástavem růstu na ED13.5 před rychle se vyvíjejícím M1 (Viriot et al. 2000). Proto jsme zanalyzovali buněčnou proliferaci R2 rudimentu versus M1 u méně a více pokročilých embryí na ED13.5, tedy před a po předpokládaném zastavení růstu R2 na ED13.5. U pokročilejších ED13.5 embryí jsme zaznamenali změnu buněčné proliferace. Na rozdíl od méně pokročilých embryí, přední část zubního epitelu a mezenchymu odpovídající R2 rudimentu se vyznačovala výrazně sníženou buněčnou proliferací. Oproti tomu molárová oblast vykazovala zvýšenou proliferaci, která je odpovědná za růst M1. Pozorovali jsme tedy počátek zastavení růstu R2 pomocí výrazného snížení buněčné proliferace oproti M1.

4.1.1 Revitalizace rudimentálního R2 zubního pupene u Sprouty2 myších mutantů – role buněčné proliferace a porovnání vůči apoptóze

Regrese R2 rudimentu může být způsobena např. potlačením FGF molekul, které jsou známy jako silné mitogeny, pomocí Sprouty molekul – inhibitorů RTK signalizace přítomných v oblasti diastemy (Klein et al. 2006). Když FGF inhibitory – Sprouty – jsou mutovány a nefunkční, dochází k vytvoření nadpočetného zubu před M1. Proto jsme se rozhodli otestovat hypotézu: Nepřítomnost FGF inhibitory zabrání zastavení růstu R2 rudimentu, a to zvýšením buněčné proliferace a snížením apoptózy v rudimentálním zubním pupenu, která vede k abnormálnímu přežívání a vzniku nadpočetného zubu u Sprouty2 mutantních myši. V porovnání s WT zárodky, mitotický index byl signifikantně vyšší a apoptóza signifikantně

nižší v oblasti R2 rudimentu u Sprouty2 mutantů a tyto výsledky potvrzují navrženou hypotézu. Proto ektopické zvýšení FGF signalizace (mutací Sprouty2) v oblasti zubních rudimentů vede k revitalizaci rudimentálního pupene R2 zvýšenou proliferací a sníženou apoptózou. Podobně je tomu u ektopického přidání FGF8 proteinu k izolované oblasti diastemy (Li et al. 2011).

4.2 Vznik zubní papily myšího prvního moláru

Studii osudu zubního mezenchymu jsme odhalili, že mezenchymové buňky přispívající ke vzniku zubní papily se nacházejí v blízkosti vnitřního zubního epitelu, mezi epitelovými smyčkami. Zbytek zubního mezenchymu přispívá ke vzniku vrstev zubního folikulu, který se stane parodontem. Tato nová data se liší od obecně přijímaného modelu vzniku zubní papily (schématicizováno v bite-it.helsinki.fi; Aberg et al. 2004; Tucker and Sharpe 2004) a dohromady s našimi dalšími poznatky přináší nový pohled na dynamiku a vznik zubní papily. Studovali jsme také buněčnou proliferaci během vzniku zubní papily. Nepodařilo se nám nalézt žádné domény vysoké buněčné proliferace specifické pouze pro zubní papilu, které by byly odpovědné za expanzi zubní papily a pomohly odlišit různé oblasti zubního mezenchymu (zubní papilu od folikulu). Tyto výsledky ukazují, že při růstu zubního základu je nezbytné zajistit buněčné dělení v zubní papile, ale i okolním expandujícím zubním folikulu během vývoje zubního pohárku.

4.2.1 Přispění mezodermu do vyvíjející se myši zubní papily

Pro analýzu buněk zubního mezenchymu, které nejsou odvozené od neurální lišty, jsme sledovali přispění mezodermu ke vzniku M1 u myši. Studovali jsme histologické řezy prvního moláru u *Mesp1cre/R26R* myši během různých stádií zubního vývoje. Buňky mezodermového původu imigrují do zubní papily na stádiu ED15,0 a dále osidlují zubní papilu a později dřeň. Zřejmou kolokalizací specifického markeru endotelových buněk (CD31) a buněk odvozených od mezodermu (*Mesp1cre* pozitivních) jsme dokumentovali imigraci endotelových buněk mezodermového původu do zubní papily a dřeně.

Tyto výsledky otevírají zajímavou otázku týkající se původu buněk nepocházejících z neurální lišty, které se v zubním mezenchymu nacházejí

během časných stádií odontogeneze, tedy před ED15,0 (Chai et al. 2000). Studie *Wnt1cre/R26R* myši (Chai et al. 2000) a naše studie *Mesp1cre/R26R* myši ukazuje, že tyto buňky nepocházejí ani z neurální lišty ani z mezodermu. Pak tedy nějaká další populace buněk přispívá k zubnímu mezenchymu během časných stádií, nebo pomocí těchto reportérových systémů nejsme schopni detekovat všechny populace mezodermových buněk a těch odvozených od neurální lišty.

4.3 Vznik a rozmístění patrových lišt a úloha buněčné proliferace

Shh exprese během vývoje patrových lišt nám umožnila určit jejich časové pořadí vzniku: Lišta číslo 8 – 2+9 – 1+3 – 4 – 5 – 6 – 7 – 7b. Analyzovali jsme roli epitelové buněčné proliferace v procesu vzniku nové patrové lišty a jejich rozmístění. Studovali jsme mitotický index a Ki67 imuno-fluorescenční barvení během vzniku lišty 5 na stádiu ED13,5. Zajímavé je, že původní (starší) lišty (na ED13,5 lišta 2 a 3) vykazovaly nižší epitelovou proliferaci než oblasti neztlustělého epitelu mezi lištami (tzv. mezery). Navrhli jsme, že tato vysoká buněčná proliferace v oblasti mezer je odpovědná za rozmístění lišt a předozadní růst patrové plotýnky. Nově vznikající lišta (lišta 5 na ED13,5) je tvořena vysokou buněčnou proliferací z epitelové oblasti přilehlé k poslední vzniklé liště (lišta 4), zatímco lišta 4 vykazovala nižší proliferaci podobně jako ostatní dříve vzniklé lišty 2 a 3.

Shh exprese se objevuje později po vzniku primitivní lišty, když je epitel zřetelně ztlustěný. Shh exprese je obecně spojována s regulací buněčné proliferace (e.g. Britto et al. 2000; Chuong et al. 2000) a proto je možné, že přítomnost Shh exprese v patrových lištách je spojena se stimulací buněčné proliferace okolní tkáně a mezer mezi lištami, zatímco samotné lišty vykazují nízkou míru epitelové proliferace, podobně jako je tomu u signalizačního centra M1 zubního zárodku (Jernvall et al. 1994; Vaahtokari et al. 1996; Cobourne et al. 2001).

5. Závěry

5.1 Vývoj rudimentálních zubních základů v tvářové oblasti myši dolní čelisti a úloha buněčné proliferace

Experimentálně jsme prokázali, že prominentní zubní základy v dolní čelisti WT myši na stádiích ED12 nebo 13 představují rudimentální struktury odpovídající MS nebo R2 rudimentům. Každý z těchto rudimentů má své vlastní signalizační centrum. Odhalili jsme, že jeden z mechanismů regrese R2 rudimentu na stádiu pupenu je výrazné snížení epitelové proliferace a integrace do M1. *Publikace 1 a 2*. Zajímavé je, že když je Sprouty 2 signalizace narušena, rudiment R2 se revitalizuje a stává se nezávislým nadpočetným zubem myši dentice v důsledku signifikantního zvýšení epitelové buněčné proliferace a snížení apoptózy. *Publikace 2*. Tudiž jsme experimentálně prokázali, že zubní zárodky na ED12 nebo 13 by neměly být zaměňovány za posloupná stadia vývoje M1, ale uznány jako odlišné rudimentální zubní zárodky zubů předků. Identifikace příslušného zubního zárodku je nezbytné pro správnou interpretaci molekulárních dat získaných na modelu myši odontogeneze. *Publikace 1 a 2*.

5.2 Vznik zubní papily myšního prvního moláru

Odhalili jsme, že myší kondenzovaný mezenchym je vysoce dynamická tkáň a pouze omezená populace mezenchymových buněk dává vznik zubní papile. Proto jsme navrhli nový model vzniku zubní papily, ve kterém epitelové smyčky neobklopují pasivní kondenzovaný mezenchym, jak je všeobecně předpokládáno, ale epitelové smyčky rostou společně s přilehlým aktivním mezenchymem. Zbylý zubní mezenchym obklopující sklovinný orgán a zubní papilu dává vznik zubnímu folikulu a oboje jsou tkáně vykazující vysokou buněčnou proliferaci během ED14,5 a ED15,5. Také jsme ukázali, že buňky zubní papily přispívají ke vzniku folikulu již během stadia pohárku myšního M1. Tyto poznatky jsou nezbytné pro cílení budoucích odontoblastů a buněk zubní papily během časných stádií odontogeneze u myši. *Publikace 3*.

Prokázali jsme, že buňky odvozené od mezodermu představují populaci buněk neodvozených od neurální lišty v zubní papile a do zubní papily začínají imigrovat na stádiu ED15,0. Tyto buňky vytvářejí síť endotelových buněk a později krevní cévy zubu. Tyto poznatky přináší důležité informace pro porozumění zubního vývoje a pro studie zabývající se vytvořením zubních náhrad. *Publikace 4.*

5.3 Vznik a rozmístění patrových lišt a úloha buněčné proliferace

Určili jsme časové pořadí vzniku patrových lišt u myši, kdy nově vzniklá ruga je vždy přidána mezi naposled vzniklou (nejmladší) lištou a prvně vzniklou (nejstarší) lištou 8, vytvářející sekvenci: 8; 2 a 9; 1; a 3; 4; 5; 6; 7. Na modelu vzniku lišty 5 jsme odhalili, že vysoká epitelová proliferace je specificky lokalizována v oblastech mezi lištami (v mezerách) a zajišťuje jejich rozmístění, a že nová lišta vzniká z oblasti vysoké epitelové proliferace v oblasti přilehlé k naposledy vzniklé liště, zatímco mezeru je vytvořena později. Tato data významně rozšiřují naše poznatky o vývoji epitelových přívěsků a epitel-mezenchymových orgánů, které mohou být snadno použitelné pro studium jiných příbuzných orgánů, jako jsou zuby. *Publikace 5.*

5.4 Obecný závěr

Zuby a patrové lišty jsou epitelové deriváty, které mají společný vývojový původ se zuby, představují důležité struktury v hlavovém vývoji. Tato dizertační práce přinesla významné poznatky týkající se buněčné proliferace a tkáňové dynamiky během vzniku a vývoje epitelových derivátů během myší embryogeneze. Objevíli jsme, že nízká buněčná proliferace hraje hlavní roli v zastavení růstu rudimentálního zubního základu myší dentice. Na rozdíl od toho, vysoká epitelová proliferace je odpovědná za revitalizaci zubního rudimentu, která má za následek vývoj nadpočetného zubu, ale také za vznik nové patrové lišty a jejich rozmístění. Také jsme odhalili dynamiku zubního mezenchymu a jeho podíl na vzniku zubní papily a folikulu. Tedy, že pouze omezená populace zubních mezenchymových buněk přispívá ke vzniku zubní papily a během specifického časového období, ED15,0, buňky mezodermového původu (budoucí endotel) začínají imigrovat do zubní papily.

6. Použitá literatura/References

- Aberg T., Wang X.P., Kim J.H., Yamashiro T., Bei M., Rice R., Ryoo H.M., Thesleff I. (2004). Runx2 mediates FGF signaling from epithelium to mesenchyme during tooth morphogenesis. *Dev Biol* 270(1):76-93.
<http://bite-it.helsinki.fi/>
- Britto J.M., Tannahill D., Keynes R.J. (2000). Life, death and Sonic hedgehog. *Bioessays*. 22(6):499-502.
- Butler P.M. (1956). The ontogeny of molar teeth. *Biol Rev*. 31:30–70.
- Chai Y., Jiang X., Ito Y., Bringas P., Han J., Rowitch D.H., Soriano P., McMahon A., Sucov H.M. (2000). Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*. 127:1671-1679.
- Chuong C.M., Patel N., Lin J., Jung H.S., Widelitz R.B. (2000). Sonic hedgehog signaling pathway in vertebrate epithelial appendage morphogenesis: perspectives in development and evolution. *Cell Mol Life Sci*. 57(12):1672-1681.
- Cobourne M.T., Hardcastle Z., Sharpe P.T. (2001). Sonic hedgehog regulates epithelial proliferation and cell survival in the developing tooth germ. *J Dent Res*. 80: 1974-1979.
- Diep L., Matalová E., Mitsiadis T.A., Tucker A.S. (2009). Contribution of the tooth bud mesenchyme to alveolar bone. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 312B(5): 510-517.
- Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75:1417-30.
- Hogan BL, Costantini F, Lacy E: Manipulating the mouse embryo, a laboratory manual. 1994.
- Jernvall J., Kettunen P., Karavanova I., Martin L.B., Thesleff I. (1994). Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene. *Int J Dev Biol*. 38(3):463-469.
- Jernvall J., Thesleff I. (2000). Repetitive signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev*. 92: 19-29.
- Klein O.D., Minowada G., Peterková R., Kangas A., Yu B.D., Lesot H., Peterka M., Jernvall J., Martin G.R. (2006). Sprouty genes control

- diastema tooth development via bidirectional antagonism of epithelial-mesenchymal FGF signaling. *Dev Cell* 11(2): 181-190.
- Lesot H, Vonesch JL, Peterka M, Turečková J, Peterková R, Ruch JV. (1996). Mouse molar morphogenesis revisited by three-dimensional reconstruction. II. Spatial distribution of mitoses and apoptosis in cap to bell staged first and second upper molar teeth. *Int J Dev Biol.* 40(5):1017-1031.
- Lesot H., Peterková R., Viriot L., Vonesch J.L., Turečková J., Peterka M., Ruch J.V. (1998). Early stages of tooth morphogenesis in mouse analyzed by 3D reconstructions. *Eur J Oral Sci.* 106 Suppl 1:64-70.
- Li L., Yuan G., Liu C., Zhang L., Zhang Y., Chen Y., Chen Z. (2011). Exogenous fibroblast growth factor 8 rescues development of mouse diastemal vestigial tooth ex vivo. *Dev Dyn.* 240(6): 1344-1353.
- Luckett W., Hartenberger J.L. (1985). *The Order Rodentia: Major Questions on Their Evolutionary Origin, Relationships and Suprafamilial Systematics* (Plenum press, NewYork).
- Luke D.A. (1984). Epithelial proliferation and development of rugae in relation to palatal shelf elevation in the mouse. *J Anat.* 138(Pt 2):251-258.
- Ohazama A., Johnson E.B., Ota M.S., Choi H.Y., Porntaveetus T., Oommen S., Itoh N., Eto K., Gritli-Linde A., Herz J., Sharpe P.T. (2008) Lrp4 modulates extracellular integration of cell signaling pathways in development. *PLoS ONE* 3:e4092.
- Palmer R.M., Lumsden A.G. (1987). Development of periodontal ligament and alveolar bone in homografted recombinations of enamel organs and papillary, pulpal and follicular mesenchyme in the mouse. *Arch Oral Biol* 32(4):281-289.
- Peterka M., Lesot H., Peterková R. (2002). Body weight in mouse embryos specifies staging of tooth development. *Connect Tissue Res* 43:186–190.
- Peterková R. (1983). Dental lamina develops even within the mouse diastema. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 3(2):133-142.
- Peterková R. (1985). The common developmental origin and phylogenetic aspects of teeth, rugae palatinae, and fornix vestibuli oris in the mouse. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 5(1):89-104.
- Peterková R., Klepáček I., Peterka M. (1987). Prenatal development of rugae palatinae in mice: scanning electron microscopic and histologic studies. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 7(2): 169-189.

- Peterková R., Peterka M., Vonesch J.L., Ruch J.V. (1995). Contribution of 3-D computer assisted reconstructions to the study of the initial steps of mouse odontogenesis. *Int J Dev Biol* 39:239–247.
- Peterková R., Lesot H., Vonesch J.L., Peterka M., Ruch J.V. (1996). Mouse molar morphogenesis revisited by three dimensional reconstruction: I) analysis of initial stages of the first upper molar development revealed two transient buds. *Int J Dev Biol* 40:1009–1016.
- Peterková R., Peterka M., Viriot L., Lesot H. (2000). Dentition development and budding morphogenesis. *J Craniofac Genet Dev Biol* 20: 158-172.
- Peterková R., Kristenová P., Lesot H., Lisi S., Vonesch J.L., Gendrault J.L., Peterka M. (2002). Different morphotypes of the tabby (EDA) dentition in the mouse mandible result from a defect in the mesio-distal segmentation of dental epithelium. *Orthod Craniofac Res.* 5(4):215-226.
- Peterková R., Lesot H., Viriot L., Peterka M. (2005). The supernumerary cheek tooth in tabby/EDA mice - a reminiscence of the premolar in mouse ancestors. *Arch Oral Biol* 50:219–225.
- Peterková R., Lesot H., Peterka M. (2006). Phylogenetic memory of developing mammalian dentition. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 306(3):234-250. *Eur J Oral Sci.* 106(2 Pt 1):667-670.
- Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Takagi A, Kitajima S, Miyazaki J, Inoue T. (1999). MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development.* 1999 126(15):3437-3447.
- Ten Cate A.R., Mills C., Solomon G. (1971). The development of the periodontium. A transplantation and autoradiographic study. *Anat Rec.* 170(3):365-379.
- Thesleff I., Sharpe P. (1997). Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev.* 67:111-123.
- Thesleff I., Keränen S., Jernvall J. (2001). Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation. *Adv Dent Res.* 15:14-18.
- Tucker A., Sharpe P. (2004). The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet* 5(7):499-508.
- Vaahokari A., Aberg T., Thesleff I. (1996). Apoptosis in the developing tooth: association with an embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF-4. *Development.* 122(1): 121-129.

- Viriot L., Lesot H., Vonesch J. L., Ruch J.V., Peterka M., Peterková R. (2000). The presence of rudimentary odontogenic structures in the mouse embryonic mandible requires reinterpretation of developmental control of first lower molar histomorphogenesis. *Int J Dev Biol.* 44(2): 233-240.
- Yoshikawa D.K., Kollar E.J. (1981). Recombination experiments on the odontogenic roles of mouse dental papilla and dental sac tissues in ocular grafts. *Arch Oral Biol.* 26(4):303-307.

7. Životopis

Osobní data:

Datum narození: 31.10.1983

Národnost: Česká

E-mail: rothovam@gmail.com

Vzdělání:

2008 – současnost **Karlova univerzita v Praze**, Přírodovědecká fakulta. Ph.D. student, obor Vývojová a buněčná biologie. Školitel MUDr. Renata Peterková Csc., Oddělení teratologie, ÚEM AVČR, Praha.

2008/2009; 2011 **King's College London**, Department of Craniofacial Development. Výměnný Erasmus program jako Ph.D. student. Školitel Abigail Tucker, PhD.

2003 - 2008 **Karlova univerzita v Praze**, Přírodovědecká fakulta. Získán titul Bc. (2006), Mgr. (2008), obor Vývojová a buněčná biologie. Školitel MUDr. Renata Peterková Csc.

Vědecké zkušenosti:

2005 - 2011 Výzkum na oddělení Teratologie, **Ústav experimentální medicíny**, Akademie věd České republiky, v.v.i. jako Bc., Mgr. a Ph.D. student. Název Ph.D. práce *“Buněčná proliferace a tkáňová dynamika zubů a jim příbuzných patrových lišt.”*. Používání metod: histologie; světelná mikroskopie; elektronová, konfokální a time-laps mikroskopie; *in vitro* tkáňové kultury; imuno-histochemie a *in situ* hybridizace.

2011 Leden-Červen

Development Travelling Fellowship & Erasmus praktická stáž; **King's College London** "*Cílení jednotlivých buněk a mapování buněčného osudu během embryonální odontogeneze.*" Používání metod: kultivace tkáňových řezů *in vitro* a GFP-DNA elektroporace.

2010 Březen- Červenec

ESF Exchange Grant; **King's College London** "*Functional Genomics: Časoprostorové vyřazení genové exprese ve vyvíjejících se myších zubech.*" Inhibice buněčné migrace použitím kultivace tkáňových řezů *in vitro* a chemických inhibitorů.

2008-2009

Jednoletý projekt na oddělení Craniofacial Development, **King's College London**. Název práce "*Dynamika vyvíjející se zubní papily.*" Sledování osudu buněk zubního mezenchymu pomocí kultivace tkáňových řezů *in vitro* a buněčného značení DiI.

Ostatní výzkumné aktivity:

27. února – 17. března 2011

Účast na "Latin America Course and Workshop: Embryonic Stem Cells as a Model System for Embryonic Development." Cuernavaca, Mexiko 2011.

- dvou týdenní intenzivní praktický kurz a přednášky zaštitěné nejlepšími experty z oblasti vývojové biologie a kmenových buněk.

Jazykové znalosti:

Angličtina (plynně), němčina (dobře)

8. Seznam publikací/List of publications

1) Procházka J, Pantalacci S, Churavá S, Rothová M, Lambert A, Lesot H, Klein O, Peterka M, Laudet V, Peterková R. Patterning by heritage in mouse molar row development. 2010. Proc Natl Acad Sci U S A:107(35):15497-15502.

IF 9.77

2) Peterková R, Churavá S, Lesot H, Rothová M, Procházka J, Peterka M, Klein OD. Revitalization of a diastemal tooth primordium in Spry2 null mice results from increased proliferation and decreased apoptosis. 2009. J Exp Zool B Mol Dev Evol.;312B(4):292-308.

IF 2.37

3) Rothová M, Peterková R, Tucker AS. New insight into the origin of the dental papilla. Manuscript submitted to Developmental Biology.

4) Rothová M, Feng J, Sharpe PT, Peterková R, Tucker AS. Contribution of mesoderm to the developing dental papilla. 2011. Int J Dev Biol. 55(1):59-64.

IF 2.86

5) Pantalacci S, Procházka J, Martin A, Rothová M, Lambert A, Bernard L, Charles C, Viriot L, Peterková R, Laudet V. Patterning of palatal rugae through sequential addition reveals an anterior/posterior boundary in palatal development. 2008. BMC Dev Biol.;8:116.

IF 2.78

Abstract

My PhD thesis has addressed specific questions regarding cell proliferation and tissue dynamics in three key areas of craniofacial development: during suppression and revitalization of tooth buds that develop in the mouse embryonic dentition as rudiments of lost premolars; during dental papilla and follicle formation of the first mouse molar; and during origin of palatal rugae on the mouse hard palate.

By evaluation of cell proliferation, we recorded a change in the proliferation pattern along the cheek region of the mandible between less and more advanced embryos at embryonic day 13.5. Thus during the time period, when the development of the large mouse rudimental premolar primordium (R2) is stopped, we showed that the arrest of the rudiment R2 is caused by exhibiting low rate of cell proliferation and high rate of apoptosis. When Sprouty gene signalling is disrupted, the premolar primordium shows rates of proliferation and apoptosis similar to the growing first molar. The R2 subsequently revitalizes and develops into a supernumerary tooth in front of the first molar. Furthermore, we discovered that the dental mesenchyme is very dynamic tissue during bud and cap stages of tooth development and that the dental papilla of the first molar originates only from a restricted region of the dental mesenchymal cells. We also proved that the influx of non-neural crest derived cells into the dental papilla is caused by immigration of mesoderm-derived endothelial cells, which starts at a specific time point, the embryonic day 15.0. Cell proliferation appeared as an important factor in palatal rugae origin and spacing. We observed high cell proliferation in regions in between palatal rugae and a burst of cell proliferation in the region of a new forming ruga.

This PhD work brings new important knowledge on the origin and patterning of epithelial appendages – experimentally proving the appearance and fate of the rudimental premolar primordia in the mouse dentition; proposing a new model of mouse dental papilla origin and indicating the mechanisms behind the origin and spacing of palatal rugae in mouse.

Key words: mouse, development, tooth, rudiment, dental mesenchyme, papilla, follicle, ruga.

1. Introduction

Teeth and palatal rugae are both important parts of craniofacial development, share common developmental processes and are fascinating models of organogenesis. These structures belong to epithelial appendages and studying their origin is a very helpful tool in understanding the mechanisms involved in the development and patterning of such organs.

1.1 Tooth development in mouse

Teeth develop from dental epithelium and neural crest-derived mesenchyme. Their development is driven by reciprocal interactions and epithelial signalling centers (Butler 1956). During mouse embryonic development the dental epithelium thickens at embryonic day (ED) 11.5, invaginates into the surrounding condensing dental mesenchyme and forms a tooth bud (ED13.5). The dental epithelium grows and starts to fold to produce firstly a cap (ED14.5), and then later a bell (ED16.5) shaped enamel organ, with the mesenchymal dental papilla forming in between the extending epithelial cervical loops. Dental mesenchyme gives rise to the dental papilla, which later becomes the dental pulp with blood vessel and nerve supply, and also to the dental follicle, which later forms the periodontium: cementoblasts, periodontal ligament and alveolar bone (Ten Cate et al. 1971; Yoshikawa & Kollar 1981; Palmer & Lumsden 1987; Diep et al. 2009).

1.2 Diastemal rudiments – lost premolars in mouse dentition

The mouse has a reduced dentition that consists of one set of teeth. In each jaw quadrant, we can find one incisor separated from three molars by a toothless gap called the diastema, where incisor, canine, and premolar teeth are present in other species. In early rodents in the mouse lineage, in some extant rodents and in rabbits, premolars develop anterior to molars (Luckett and Hartenberger 1985). Despite the lack of premolars in the adult mouse dentition, there is morphological evidence for large bud-like structures that develop earlier, anterior to the upper and lower first molar (M1), and which have been interpreted as rudimental (vestigial) premolar buds (Peterková 1983; Peterková et al. 1995, 1996, 2000, 2002, 2006; Lesot et al. 1998; Viriot et al. 2000). However, the development of these rudiments has not yet been supported by an experimental or molecular study. That is probably

why the large tooth buds appearing first in the cheek region at the beginning of mouse odontogenesis, i.e. before ED14.0 have still been generally considered as the developing M1 (e.g. <http://bite-it.helsinki.fi/>). To address this gap in our knowledge, fate mapping the rudimental tooth buds, localization of Shh expressing signalling centers, and analysis of the spatio-temporal differences in cell proliferation pattern, are key experiments to allow an understanding of the initially progressive development and later growth arrest of the rudimental tooth germs in front of the mouse M1.

1.3 Supernumerary teeth in mouse dentition

In some mutant mice there is a supernumerary tooth found anteriorly to the M1 in the originally toothless diastema. These cases are results of molecular disturbances caused by various gene alterations, e.g. when Sprouty genes are mutated and therefore FGF signalling is up-regulated in diastema region (Klein et al. 2006).

The origin of the supernumerary tooth in front of the M1 in some mutant mice from a rudimental diastemal tooth primordium (Peterková 1983) has been supported by morphological (Peterková et al. 2002, 2005, 2006) and molecular (Klein et al. 2006; Ohazama et al. 2008) data. However the presumed revival of the diastemal (premolar) rudiment has not been documented at the level of the morphogenetic mechanisms such as the role of changes in cell proliferation and apoptosis.

1.4 The first molar in mouse dentition and dental mesenchyme development

From ED14.0 onwards, the M1 is the prominent structure in the mouse embryonic cheek region. At this stage, the mesenchymal dental papilla starts to form. The condensed dental mesenchyme surrounding the epithelial tooth bud and cap is considered as a passive tissue, which is encompassed by the in-growing cervical loops of active epithelium. However a recent study has shown that the dental mesenchyme on either side of the epithelial bud is a dynamic cell population contributing to the dental follicle and later to alveolar bone formation (Diep et al. 2009). Therefore the fate of the cells of the original dental mesenchymal condensation, their contribution to the dental papilla and follicle and the cell

proliferation during the dental papilla formation is an important area for further in-depth investigation.

The mouse dental mesenchyme has been shown to be of neural crest origin (Chai et al. 2000). Interestingly, these authors also reported presence of some non-neural crest cells in the dental mesenchyme from the bud stage of tooth development onwards and their origin is unknown. Together with the investigation of the fate of the dental mesenchyme during the dental papilla formation, it seems necessary to also explore the identity of these non-neural crest cells in the mouse dental papilla and reveal if and when any mesoderm-derived cells contribute to the formation of the dental papilla.

1.5 Palatal rugae development in mouse

Palatal rugae which have common developmental origin with teeth (Peterková 1985) are parallel transverse ridges present on the hard palate and together with the teeth and the tongue, the rugae participate in mastication, palatal shelf elevation and secondary palate formation (Luke 1984; reviewed in Peterková et al. 1987).

Laboratory mice have usually 8 to 9 sets of regularly arranged rugae. The beginning of rugae development in mouse occurs at the same time and manner as teeth. The epithelium thickens at ED11.5 and, together with the adjacent mesenchymal condensation, forms a ruga primordium. The next step of ruga development is protrusion of the thickened epithelium into the oral cavity as a convex bud – the primitive ruga. The primitive rugae appear subsequently over time, and by ED15.5 the last formed ruga is present in the palate. At ED17.5, the rugae start to keratinize and form the definitive rugae of the hard palate (Peterková et al. 1987).

Rugae development provides a new and simple model for studying mechanisms of origin and development of epithelial appendages such as teeth and can also bring new insights into the general principles of morphogenesis and palatogenesis. Rugae development is an interesting sequential process, which has not yet been extensively studied. There are many basic questions that need to be addressed, such as how exactly the palatal rugae appear in time and space during palate development and what is the role of cell proliferation in this process.

2. Aims of the thesis

2.1 Development of the rudimental cheek tooth primordia in mouse mandible and the role of cell proliferation

To clarify whether the prominent bud-like structures detected in WT mouse mandible at embryonic day 12 or 13 reflect different rudimental tooth germs in front of the M1 or successive stages of M1 development.

Publication 1.

To verify the hypothesis that the supernumerary tooth observed in Sprouty2 mutant mice results from the revitalization of a rudimental tooth primordium in front of the lower M1 including increase of cell proliferation and/or decrease of apoptosis in the rudimental dental epithelium.

Publication 2.

2.2 Origin of the dental papilla of the first mouse molar

To reveal the origin of the mesenchymal dental papilla of the mouse lower M1, the dynamics and cell proliferation of the dental mesenchyme during dental papilla formation and to investigate the developmental relationships between the condensed dental mesenchyme, dental papilla and follicle.

Publication 3.

To explore the contribution of mesoderm-derived cells as an influx of non-neural crest cells to the dental papilla of the mouse lower M1, the exact timing and the cell identity.

Publication 4.

2.3 Palatal rugae origin, spacing and the role of cell proliferation

To establish a precise temporal sequence of origin of the mouse palatal rugae (which have a common developmental origin with teeth) and the role of epithelial cell proliferation during rugae appearance and spacing.

Publication 5.

3. Material and Methods

MATERIAL

CD1 mice – WT outbred mouse line (Charles River)

Sprouty 2 mutant mouse line (Klein et al. 2006)

Mesp1cre transgenic mouse line crossed with R26R mouse line to construct the reporter line *Mesp1cre/R26R* (Saga et. al. 1999)

Staging

The females were mated over night and noon after the detection of the vaginal plug was considered as ED 0.5. Immediately after taking the embryo out of the uterus, the wet body weight was determined to specify the chronological stages in more details (Peterka et al. 2002).

METHODS

Slice culture *in vitro* method

ED13.5; ED14.5 or ED15.5 mouse mandibles of CD1 embryos were dissected out and sliced using a McIlwain tissue chopper (Mickle Laboratory Engineering Co., Ltd. UK) into frontal slices 250 µm thick and cultured *in vitro* (Diep et al. 2009).

DiI, DiO cell labelling

DiI and DiO (viable lipophilic dyes, Invitrogen) were injected into tissue slices before *in vitro* culture using a mouth pipette and PicoSpritzer III (Intracel).

GFP electroporation cell labelling

pCAB-mGFP construct, which expresses a myristylated enhanced GFP, was electroporated into tissue slices containing M1 tooth germ before *in vitro* culture.

X-Gal staining

Mouse lower molar tooth germs were dissected from *Mesp1cre/R26R* positive embryonic or postnatal heads (ED14.5; ED15.0; ED16.5; P5; P18), fixed in 4% PFA for 45 mins, stained in X-Gal staining solution at 37°C for 42 hours, embedded in wax and sectioned to reveal the lacZ activity in mesoderm derived cells.

Immuno-fluorescent staining

We used wax and frozen histological sections and tissue slices after *in vitro* culture to analyze cell proliferation (Ki67 and PH-3 antibodies) and presence of endothelial cells (CD31 antibody).

Ki67 primary antibody (Rabbit polyclonal IgG to Ki67; Abcam; #Ab15580)

PH-3 primary antibody (Mouse monoclonal IgG to phosphohistone 3; Abcam; #Ab14955)

CD31 primary antibody (Rabbit polyclonal IgG to CD31; Abcam; #Ab28364)

Quantitative evaluation of mitotic index

Evaluations were done on serial frontal histological sections by counting the percentage of the total number of mitotic cells in the total number of cells of the concerned area.

3D reconstructions of dental epithelium

Computer-aided 3D reconstructions of the developing lower cheek dental and adjacent oral epithelium were drawn from serial frontal histological sections at 7 μ m intervals and the digitalization of the serial drawings, the correlation of successive images and the generation of 3D pictures have been previously described (Lesot et al. 1996).

Whole mount in situ hybridization

The in situ hybridization was performed using standard methods (Hogan et al. 1994) and the Shh probe (kind gift from Prof. McMahon) was transcribed *in vitro* from plasmids described previously (Echelard et al. 1993).

4. Results and discussion

4.1 Development of the rudimental cheek tooth primordia in mouse mandible and the role of cell proliferation

By mapping the Shh expression, which is a marker of tooth signalling centers during odontogenesis (Thesleff et al. 2001), we were able to distinguish a series of three Shh-signalling centers, which co-localized with three successive buds (MS, R2, and M1, respectively). This finding strongly contrasts with the classical interpretation of Shh expression in the cheek region of mouse mandible, which is generally attributed to successive stages of M1 development during ED12 to 14 (e.g. Jernvall and Thesleff 2000).

It is assumed that the rudimental buds pass through a period of a progressive growth before their growth arrests in front of the rapidly growing M1 from ED13.5 (Viriot et al. 2000). Therefore we investigated cell proliferation in the R2 bud versus molar region in less and more advanced embryos at ED13.5, thus before and after the presumed growth arrest of the R2 at ED13.5. In the more advanced ED13.5 embryos, we recorded a change of cell proliferation pattern. In comparison to the less advanced embryos, the anterior epithelium and mesenchyme of the R2 exhibited a marked reduction of the proliferation labelling. In contrast the M1 started to grow and became prominent due to the increase of cell proliferation in the dental epithelium and the adjacent condensed mesenchyme. We observed the onset of the regression of the R2 rudiment by a marked decrease of the cell proliferation marker in the R2 region compared to the emerging M1 in the posterior area.

4.1.1 Revitalization of the rudimental R2 tooth bud in Sprouty2 mouse mutants – A role of cell proliferation and comparison to apoptosis

The regression of the R2 rudiment could be caused for example by a suppression of FGF molecules, which are known as strong mitogens, by members of the Sprouty family – the RTK signalling inhibitors present in the diastemal region (Klein et al. 2006). Therefore, when the FGF antagonists – Sprouty - are mutated and missing, the supernumerary tooth develops in front of the M1. We decided to test a hypothesis: The absence of an FGF antagonist prevents the growth arrest of the R2 by increasing cell proliferation and decreasing apoptosis in the rudimental tooth bud, which

results in its abnormal survival and supernumerary tooth formation in *Spry2* mutant mouse embryos. Compared to WT embryos, the mitotic index was significantly higher and the apoptosis was significantly lower in the R2 region of *Spry2* mutants and these data confirmed our proposed hypothesis. Therefore the ectopic increase of the FGF signalling in the rudiments region leads to the revitalization of the rudimental tooth bud R2 by increased cell proliferation and decreased apoptosis. Similarly to addition of exogenous FGF8 protein to isolated diastemal regions (Li et al. 2011).

4.2 Origin of the dental papilla of the first mouse molar

By investigation of the fate of dental mesenchyme, we revealed, that the mesenchymal cells contributing to the dental papilla formation are located in close proximity to the inner dental epithelium (IDE), in between the epithelial cervical loops. The rest of the dental mesenchyme contributes to the formation of layers of the dental follicle, which will become the periodontium. These new data are in contrast to the generally assumed model of dental papilla origin (as schematized for example in bite-it.helsinki.fi; Aberg et al. 2004; Tucker and Sharpe 2004) and together with our further investigations bring new insights into the dynamics and origin of the dental papilla. We studied cell proliferation pattern during the dental papilla formation. However, we were not able to detect any specifically located domain of high cell proliferation restricted only within the mesenchymal dental papilla, which would be responsible for the dental papilla expansion and which would allow the different regions of the dental mesenchyme (the dental papilla from the follicle) to be distinguished. These results suggest that as the tooth germ enlarges during development, not only the dental papilla expands but also the dental follicle, which is formed from the mesenchyme surrounding the dental papilla and is also capable of high cell proliferation during cap formation.

4.2.1 Contribution of mesoderm into the developing mouse dental papilla

To analyze the non-neural crest cell contribution to the dental mesenchyme, we traced the contribution of mesoderm to the M1 *in vivo*. We looked at histological sections of the *Mesp1cre/R26R* reporter mouse during various stages of tooth development. Cells of mesodermal origin entered the developing dental papilla at ED15.0 and then further populated

the dental papilla. A clear co-localization of CD31 (a specific endothelial marker) and mesoderm-derived cells was detected in the dental pulp, documenting the immigration of endothelial cells of mesodermal origin into the dental papilla.

Our findings open an interesting question regarding the origin of the non-neural crest cells found at earlier stages of tooth development, thus before ED15.0 (Chai et al. 2000). The *Wnt1cre/R26R* (Chai et al. 2000) and our *Mesp1cre/R26R* analysis suggest that these cells appear to be neither of neural crest nor of mesodermal origin. Thus either some other cell population contributes to the tooth mesenchyme at these early stages, or perhaps not all mesoderm or neural crest derived cells are labelled by the above-mentioned reporters.

4.3 Palatal rugae origin, spacing and the role of cell proliferation

Shh expression during rugae development allowed us to define a temporal sequence for rugae appearance: Ruga number 8 – 2+9 – 1+3 – 4 – 5 – 6 – 7 – 7b. To analyze the role of epithelial cell proliferation in the process of formation of a new ruga and its spacing, we studied cell proliferation pattern by evaluation of epithelial mitotic index and Ki67 immuno-staining during emergence of ruga 5 at ED13.5. Interestingly, the former (older) rugae (at ED13.5 ruga 2 and 3) exhibited lower epithelial cell proliferation than the regions of non-thickened epithelium (so called gaps). We propose that this high epithelial cell proliferation in the gaps is responsible for the spacing of the rugae and anterior/posterior growth of the palate. A newly forming ruga (ruga 5 at ED13.5) seemed to form from a burst of cell proliferation in the epithelial region immediately posterior to ruga 4 (the last formed ruga at this stage), which exhibited lower epithelial cell proliferation as the former formed rugae 2 and 3.

Shh expression was found only later during formation of a primitive ruga when the epithelium is clearly thickened. The Shh expression is generally linked with regulation of cell proliferation (reviewed e.g. in Britto et al. 2000; Chuong et al. 2000) and therefore the presence of Shh expression in rugae might be involved in the stimulation of cell proliferation of the surrounding tissue and the gaps in between rugae, while the formed rugae themselves remain with low-level proliferation in the similar manner as the Shh-signalling center of the M1 tooth germ (Jernvall et al. 1994; Vaahtokari et al. 1996; Cobourne et al. 2001).

5. Conclusions

5.1 Development of the rudimental cheek tooth primordia in mouse mandible and the role of cell proliferation

We experimentally proved that the prominent tooth primordia in WT mouse mandible at ED12 or 13 represent rudimental structures corresponding to MS or R2 rudiments, respectively. Each rudiment has its own signalling center. We revealed that one of the mechanisms of the R2 rudiment regression at a bud stage is a marked decrease of epithelial cell proliferation and integration into M1. *Publication 1 and 2*. Interestingly, when Sprouty signalling is altered, the rudiment R2 is revitalized as a result of significant increase of epithelial cell proliferation and decrease of apoptosis to become an independent supernumerary tooth in mouse dentition. *Publication 2*. Therefore we experimentally demonstrated that the prominent tooth primordia at ED12 or 13 should not be misinterpreted as subsequent stages of progressive development of M1 anymore but recognized as distinct rudimental primordia of ancestral teeth. The appropriate tooth primordia identification is essential for correct interpretation of molecular data achieved in the mouse odontogenesis model. *Publication 1 and 2*.

5.2 Origin of the dental papilla of the first mouse molar

We revealed that the mouse condensed dental mesenchyme is a highly dynamic tissue and only a restricted population of mesenchymal cells gives rise to the dental papilla. Therefore we proposed a new model of dental papilla origin, where the cervical loops do not encompass the passive condensed mesenchyme as generally assumed but the epithelial loops grow together with the adjacent active mesenchyme. The remaining dental mesenchyme surrounding the enamel organ and dental papilla gives rise to the dental follicle and both are highly proliferative tissues during ED14.5 and ED15.5. We also showed that the dental papilla cells contribute to the dental follicle formation from as early as the cap stage of mouse molar development. This knowledge is necessary for targeting the progenitors of odontoblasts and dental papilla cells during early stages of mouse odontogenesis. *Publication 3*.

We proved that mesoderm-derived cells represent the contribution of non-neural crest cells into the dental papilla, starting to immigrate at specific time point – at ED15.0. These cells create a network of endothelial cells,

forming the blood vessels of the tooth. This brings an important advance in our understanding of how a tooth develops and is particularly relevant to studies which aim to create bioengineered teeth. *Publication 4.*

5.3 Palatal rugae origin, spacing and the role of cell proliferation

We established a temporal sequence of mouse rugae appearance, when the newly forming ruga is always added in between the last formed (the youngest) ruga and the first formed (the oldest) ruga 8, forming the temporal sequence: 8; 2 and 9; 1 and 3; 4; 5; 6; 7. We revealed in a model of ruga 5 formation, that high epithelial cell proliferation is specifically located in the regions in between rugae (gaps) to provide the rugae spacing and that the new ruga is formed as a burst of epithelial cell proliferation right next to the last formed ruga, while the gap in between is formed later. These data importantly broaden our knowledge about epithelial appendages patterning and epithelial-mesenchymal organogenesis and can be useful and translated into development of other epithelial appendages, such as teeth. *Publication 5.*

5.4 General conclusion

Teeth and palatal rugae are epithelial appendages that have common developmental origin and represent important structures in craniofacial development. My PhD study has brought an important insight into the role of cell proliferation and tissue dynamics during origin and development of the epithelial appendage in mouse embryos. We discovered that low cell proliferation plays a major role in the growth arrest of the abortive rudimental tooth germ in mouse dentition. In contrast, high epithelial cell proliferation is involved in both, tooth rudiment revitalization resulting in a supernumerary tooth development and in a new ruga formation and spacing. We also revealed tissue dynamics of the dental mesenchyme and its contribution to the dental papilla and follicle formation. Only a restricted population among the original mesenchymal cell population contributes to the dental papilla formation and from a specific time point, the embryonic day 15.0, the dental papilla is immigrated by mesodermal cells (the prospective endothelium).

6. Curriculum vitae

Personal data:

Date of birth: 31st October 1983

Nationality: Czech

E-mail: rothovam@gmail.com

Education:

- 2008 - present** **Charles University in Prague**, Faculty of Sciences. Ph.D. student, Developmental and Cell Biology. Supervisor Dr. Renata Peterkova, Department of Teratology, IEM ASCR, Prague.
- 2008/2009; 2011** **King's College London**, Department of Craniofacial Development. Erasmus Exchange Programme as a Ph.D. student. Supervisor Dr. Abigail Tucker.
- 2003 - 2008** **Charles University in Prague**, Faculty of Sciences. Graduated B.Sc. (2006), M.Sc. (2008), Developmental and Cell Biology. Supervisor Dr. R. Peterkova.

Research experiences:

- 2005 - 2011** Research at the Department of Teratology, **Institute of Experimental Medicine**, Academy of Sciences of the Czech Republic as a B.Sc., M.Sc. and Ph.D. student. Ph.D.thesis entitled "Cell proliferation and tissue dynamics during development of teeth and tooth related palatal rugae". Using techniques such as histology; light, electron, confocal and time-lapse microscopy; *in vitro* cell-tissue culture; immuno-histochemistry and *in situ* hybridization.

- 2011 Jan-June** Development Travelling Fellowship & Erasmus Practical Placement; **King's College London** "*Single cell targeting and fate mapping during embryonic tooth development.*" Using slice culture *in vitro* method and GFP-DNA electroporation.
- 2010 March-July** ESF Exchange Grant; **King's College London** "*Functional Genomics: Temporospacial knockdown of gene expression in developing murine teeth.*" Inhibition of cell migration using slice culture *in vitro* method and chemical inhibitors.
- 2008-2009** One-year research project at the Department of Craniofacial Development, **King's College London**, entitled "*Dynamics of the developing dental papilla.*" Fate-mapping of the embryonic murine tooth germ using *in vitro* cell-tissue culture system, DiI labelling.

Other research activities:

27th February – 17th March 2011

Participation at Latin America Course and Workshop: Embryonic Stem Cells as a Model System for Embryonic Development. Cuernavaca, Mexico 2011.
- two weeks intensive practical training and lectures from the key experts in the stem cell and developmental biology field.

Language skills:

Czech (native), English (fluent), German (good)

Tato dizertační práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky (grant CZ:GACR:GA304/07/0223) a Akademií věd České republiky (AV0Z50390512).

Výměnný program s King's College London byl finančně podpořen grantem CZ:GACR:GA304/07/0223; Erasmus výměnným programem a granty European Science Foundation a Development Travel Fellowship.

This PhD work was supported by The Grant Agency of the Czech Republic (grant CZ:GACR:GA304/07/0223) and The Academy of Sciences of the Czech Republic (AV0Z50390512).

The exchange program with King's College London was funded by the grant CZ:GACR:GA304/07/0223; the Erasmus Exchange Program; the European Science Foundation and the Development Travel Fellowship.